

REC'D 28 NOV 2003
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

29 SEP. 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

16 bis, rue de Saint Pétersbourg
75000 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle

INPI

N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 010801

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES
DATE

LIEU 13 SEPT 2002

N° D'ENREGISTREMENT 75 INPI PARIS B

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0211416

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE
PAR L'INPI 13 SEP. 2002

Vos références pour ce dossier

(facultatif)

239864-D20360-NT

Confirmation d'un dépôt par télécopie

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSEÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

NATURE DE LA DEMANDE

N° attribué par l'INPI à la télécopie
Cochez l'une des 2 cases suivantes

Demande de brevet



Demande de certificat d'utilité



Demande divisionnaire



Demande de brevet initiale



ou demande de certificat d'utilité initiale



Transformation d'une demande de
brevet européen Demande de brevet initiale



Date

Date

Date

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

MESURE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES COMME MARQUEUR D'ACTIVATION DE CELLULES
EFFECTRICES.

DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date N°

Pays ou organisation

Date N°

Pays ou organisation

Date N°

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

Personne morale Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES
BIOTECHNOLOGIES

Prénoms

GROUPEMENT D'INTERET PUBLIC

Forme juridique

180036147

N° SIREN

Zone d'activité de Courtabœuf - 3, avenue des Tropiques 91940 LES ULIS

Code APE-NAF

Domicile

Rue

ou

Code postal et ville

siège

Pays

Nationalité

FRANCE

N° de téléphone (facultatif)

Française

Adresse électronique (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

Remplir impérativement la 2^{me} page

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES

Réserve à l'INPI

DATE

LIEU 13 SEPT 2002

75 INPI PARIS B

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0211416

DB 540 W / 01001

Vos références pour ce dossier :
(facultatif)

239864 NT

MANDATAIRE (si la ligne 1 n'est pas remplie)

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

N ° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adressse Rue

Cabinet REGIMBEAU

Code postal et ville

75847 PARIS CBDEX 17

Pays

01 44 29 35 00

N ° de téléphone (facultatif)

01 44 29 35 99

N ° de télécopie (facultatif)

info@regimbeau.fr

Adresse électronique (facultatif)

INVENTEUR (si la ligne 1 n'est pas remplie)

Les demandeurs et les inventeurs
sont les mêmes personnes

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

Oui

Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)

DÉPÔT DE LA DEMANDE

Établissement immédiat
ou établissement différé

Uniquement pour les demandes de brevet (y compris division et transformation)

PAIEMENT ÉCHELONNÉ DE LA REDESENCE

(si deux demandes)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt

Oui

Non

RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES

Uniquement pour les personnes physiques

Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG

Si vous avez utilisé l'imprimé « Suisse »,
indiquez le nombre de pages jointes

SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

92-1001

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

5 La présente invention concerne un procédé pour mesurer l'activation d'une cellule effectrice appartenant au système immunitaire ou modifiée in vitro par un anticorps monoclonal (AcMo) ou polyclonal, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence de l'anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité 10 d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

L'immunothérapie à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux est en passe de devenir un des aspect les plus importants de la médecine. En revanche, les résultats obtenus lors d'essais cliniques apparaissent contrastés. En effet, il peut s'avérer que 15 l'anticorps monoclonal ne soit pas suffisamment efficace. Aujourd'hui, la recherche s'oriente sur le fragment Fcγ de l'immunoglobuline afin d'améliorer les propriétés des anticorps. A terme, cela devrait permettre l'obtention d'anticorps qui interagissent et activent les récepteurs des cellules effectrices (macrophage, lymphocyte T, H et NK).

20 L'activité biologique de certaines immunoglobulines G est dépendante de la structure des oligosaccharides présents sur la molécule, et notamment sur sa partie Fc. Les molécules IgG de toutes les sous-classes humaines et murines possèdent un N-oligosaccharide fixé au domaine CH₂ de chaque chaîne lourde (au résidu Asn 297 pour les IgG humaines). L'influence de ce résidu glycannique sur la capacité de l'anticorps 25 à interagir avec des molécules effectrices (Fc récepteurs et complément) a été démontrée. L'inhibition de glycosylation d'une IgG1 humaine, par culture en présence de Tunicamycine, provoque par exemple une diminution de 50 fois de l'affinité de cet anticorps pour le récepteur FcγRI présent sur les monocytes et macrophages (Leatherbarrow et al, 1985). La fixation au récepteur FcγRIII est également affectée 30 par la perte de carbohydrates sur l'IgG, puisqu'il a été décrit qu'une IgG3 non

glycosylée est incapable d'induire une lyse de type ADCC par l'intermédiaire du récepteur Fc γ RIII des cellules NK (Lund et al, 1990).

5 Mais, au-delà de la présence nécessaire de ces résidus glycanniques, c'est plus précisément l'hétérogénéité de leur structure qui peut aboutir à des différences dans la capacité à engager des fonctions effectrices. Des profils de galactosylation variables en fonction des individus (IgG1 humaines sériques) ont été observés. Ces différences reflètent probablement des disparités dans l'activité des galactosyltransférases et autres enzymes entre les clones cellulaires de ces individus (Jefferis et al, 1990). Alors que 10 cette hétérogénéité normale des processus post-traductionnels génère différentes glycoformes (même dans le cas d'anticorps monoclonaux), elle peut conduire à des structures atypiques associées à certains états pathologiques comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, pour lesquelles une proportion importante de résidus agalactosylés a été mise en évidence (Parekh et al, 1985).

15

Devant la complexité posée par la relation existante entre les différentes structures glycanniques et l'activité des anticorps, il serait utile de pouvoir discriminer rapidement quels sont les anticorps efficaces et permettre ainsi de sélectionner des lignées cellulaires produisant des anticorps ayant une meilleure efficacité ou des 20 propriétés spécifiques dans l'activation ou l'inhibition de certains composants du système immunitaire.

Dans la demande FR 0004685 du 12 avril 2000 (LFB), nous avions décrit un nouveau procédé de préparation d'un anticorps monoclonal capable d'activer les cellules 25 effectrices exprimant le Fc γ RIII. Dans ce procédé, on teste des anticorps monoclonaux provenant d'hybridomes ou de lignées transfectées dans un mélange réactionnel comprenant les cellules cibles desdits anticorps, des cellules effectrices comprenant des cellules exprimant le Fc γ RIII et des IgG polyvalentes. Ainsi, on peut déterminer le pourcentage de lyse des cellules cibles et sélectionner des anticorps monoclonaux qui 30 activent les cellules effectrices provoquant une lyse significative des cellules cibles

(activité ADCC de type FcγRIII). Par exemple, la partie Fab de l'anticorps anti-D va se fixer sur l'antigène Rhésus D porté par les hématies. Suite à cette fixation, sa partie Fc se fixe alors sur le récepteur Fc gamma RIII ou CD16 de la cellule effectrice (cellule NK). Ce « sandwich » induit la sécrétion de substances chimiques de type perforines qui vont lyser le globule rouge. Il s'agit donc d'une cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante (CCDA) ou ADCC en anglais. Pour se rapprocher des conditions physiologiques, le test est effectué en présence d'immunoglobulines polyvalentes humaines.

5

10 Dans le cadre de l'invention, on a trouvé que la fixation d'un anticorps sur son ligand peut induire une activation de la cellule Jurkat transfectée CD16 induisant la sécrétion d'IL2. Une forte corrélation est observée entre la sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16 et l'activité ADCC médiée par le CD16 des cellules effectrices.

15 L'invention propose l'utilisation du test jurkat CD16 par mesure d'IL2 sécrétée comme alternative aux tests ADCC, en particulier pour un suivi ou le criblage d'activité biologique d'anticorps à usage thérapeutique.

20 **Description**

Ainsi, la présente invention se rapporte à un procédé pour mesurer l'activation d'une cellule effectrice appartenant au système immunitaire, transformée ou non, par un anticorps monoclonal (AcMo) ou polyclonal, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence de l'anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

25

En entend par cellule transformée, une cellule modifiée génétiquement de sorte à exprimer un récepteur, en particulier le récepteur CD16.

30

De préférence, on utilise une lignée Jurkat transfectée avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16 comme cellule effectrice. Cette lignée est particulièrement avantageuse car elle est immortalisée et se développe indéfiniment dans des milieux cultures.

5

Parmi les cytokines que l'on peut quantifier au moins une cytokine sélectionnée parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6..., TNFa et IFNy. On choisit avantageusement l'interleukine IL-2.

10 Le taux de cytokine produite est un marqueur d'activation ou d'inhibition des cellules effectrices.

De préférence le taux d'interleukine IL2 sécrétée reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction FC) et à son efficacité (site antigénique) de liaison à l'antigène. La mesure du taux d'IL2 est corrélée à une activité du type ADCC.

20 Dans un autre aspect, l'invention concerne un procédé pour évaluer l'efficacité d'un anticorps monoclonal ou polyclonal, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence d'un anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

25 Ce procédé est particulièrement adapté pour évaluer l'efficacité d'un anticorps monoclonal ou polyclonal de spécificité anti-Rh D du globule rouge humain.

30 Dans un autre aspect, l'invention concerne un procédé pour évaluer la capacité d'une cellule à produire un anticorps monoclonal efficace, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence d'un anticorps et

de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

5 Ce procédé peut être mise en œuvre pour des cellules utilisées pour la production d'anticorps thérapeutiques, telles que CHO, YB2/0, les cellules lymphoblastoïdes humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines.

10 Ce procédé peut également être appliquée à l'évaluation de la production d'AcMo par des plantes transgéniques ou de mammifères transgéniques.

15 Dans un aspect complémentaire, l'invention vise un procédé pour évaluer l'efficacité et de l'intégrité d'anticorps polyclonaux après une étape ou plusieurs étape de purification, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence de l'anticorps purifié et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

20 Les procédés décrits ci-dessus peuvent éventuellement être réalisés en présence d'immunoglobulines humaines (IVIg).

25 A titre d'exemple, on sélectionnera les anticorps pour lesquels une augmentation supérieure à 100%, 250%, 500%, ou 1000% du taux de libération d'IL-2 est observée par rapport au contrôle en absence d'anticorps ou un anticorps donné comme référence négative.

L'invention vise également l'utilisation du procédé décrit ci-dessus pour sélectionner des anticorps efficace pour un traitement thérapeutique.

A l'inverse, l'invention vise également à évaluer la capacité de réponse des cellules effectrices du patient lorsqu'elles sont mises en présence d'un anticorps monoclonal ou polyclonal donné destiné à traiter le patient et qu'elles sont mises dans les conditions décrites de l'invention.

5

Légende

Figure 1 : Description du test ADCC CMN.

Les cellules mononucléées en présence de Tégéline (IVIg) sont incubées avec les 10 anticorps anti-Rhésus D et des hématies Rhésus + (cible). Après une nuit à 37°C, on mesure la lyse des hématies par mesure de l'hémoglobine relarguée dans le milieu réactionnel.

Figure 2 : Description du test ADCC NK

15 Les cellules NK purifiées sont incubées avec les anticorps anti-Rhésus D et des hématies Rhésus + (cible). Après une nuit à 37°C, on mesure la lyse des hématies par mesure de l'hémoglobine relarguée dans le milieu réactionnel.

Figure 3 : Résultats ADCC NK et inhibition par l'anti-CD16 « 3G8 ».

20

Figure 4 : Description du test Jurkat CD16 .

Des cellules Jurkat CD16 sont mélangées avec différents anticorps anti-D en présence d'hématies rhésus + et de PMA. Après une nuit d'incubation, la libération d'IL-2 dans le surnageant est quantifiée par ELISA.

25

Figure 5 : Résultats du test Jurkat CD16.

Commentaires : les anticorps positifs en ADCC-NK induisent une sécrétion d'IL2 en présence de Jurkat CD16 et de leur cible.

30

Exemple 1 : Test Jurkat CD16**Anticorps témoins :**

Anticorps polyclonaux WinRho, anticorps monoclonal DF5-EBV, anticorps 5 monoclonal DF5-YB2/0

Principe :

Ce test estime la capacité des anticorps anti-D à se fixer sur le récepteur CD16 (Fc gamma RIIL) exprimé sur les cellules Jurkat CD16 et à induire la sécrétion d'IL2.

10 Ce test consiste à mettre en contact en P96 : les anticorps anti-D, les hématies Rhésus positives traitées à la papaïne, les cellules Jurkat CD16 et du PMA.

Après une nuit d'incubation à 37°C, on centrifuge les P96 et on dose dans le surnageant la quantité d'IL2 secrétée.

Mode opératoire**15 Matériel**

Anticorps témoins positif : Poly-D WinRho, DF5 YB2/0.

Anticorps témoins négatifs : DF5

Hématies Rhésus positif

Cellules Jurkat CD16

20 Kit dosage IL2 : Quantikine de chez R/D.**Méthode**

Traitements à la papaïne des hématies.

1ml de culot d'hématies incubé avec 1ml d'une solution de papaïne (1mg/ml) diluées en PBS incubée 10mn à 37°C. Puis 3 lavages en H2O-NaCl 0.15M.

25 Mélange réactionnel :

-Anticorps : 50µl d'une dilution à 150ng/ml en IMDM 5% SVF

-PMA 50µl d'une dilution à 40ng/ml en IMDM 5% SVF

-Hématies traitées à la papaïne. 50µl à 8 106/ml en IMDM 5% SVF

-Jurkat CD16. 50µl à 2x106/ml en IMDM 5% SVF

30 Incubation 1 nuit à 37°C

Puis centrifugation des plaques, prélèvement de 100µl de surnageants et dosage d'IL2 avec le kit commercial. lecture à 450nm.

On donne les valeurs (en pg/ml) sous forme d'histogramme pour chaque échantillon.

5

Exemple 2 : Corrélation in vitro entre ADCC et libération d'IL-2 de Jurkat CD16.

Pour cette étude, 3 anticorps monoclonaux anti-D ont été comparés.

10 Mab DF5-EBV a été produit par des Lymphocytes B humain obtenus chez un donneur immunisé D-négatif et immortalisés par transformation avec EBV. Cet anticorps a été utilisé comme contrôle négatif étant donné qu'il a été montré qu'il est incapable d'éliminer les globules rouges rhésus positifs de la circulation lors d'un essai clinique. L'anticorps monoclinal (Mab) DF5-YB2/0 a été obtenu en exprimant la séquence primaire de EBV-DF5 dans la lignée YB2/0. L'anticorps monoclinal R297 et d'autres anticorps recombinants ont également été exprimés dans YB2/0.

15

On a testé ces anticorps in vitro pour leur capacité à induire une lyse des globules rouges traités à la papaïne en utilisant des cellules PBL comme effecteur.

20 Tous les tests ont été effectués en présence d'immunoglobulines humaines (IVIg) de sorte à reconstituer les conditions physiologiques.

On pense que les IVIg se lient avec une haute affinité au FcgammaRI (CD64). Les deux Mab DF5-YB2/0 et R297 induisent une lyse des globules rouges à un niveau comparable à celui des anticorps WinRho. En revanche, le Mab DF5-EBV est complètement inefficace.

25 Dans une deuxième série d'expérience, des cellules NK purifiées et des globules rouges non traités ont été utilisés comme effecteur et cibles respectivement. Après 5 heures d'incubation, les Mabs antiD-R297 et DF5-YB2/0 se sont montrés capables de provoquer la lyse des globules rouges, alors que DF5-EBV reste inefficace.

Dans ces deux expériences, la lyse des globules rouges a été inhibée par Mab 3G8 dirigé contre le FcgammaRIII (CD16).

Pris ensemble, ces résultats démontrent que l'ADCC provoquée par Mab R297 et Mab 5 DF5-YB2/0 implique le FcgammaRIII exprimé à la surface des cellules NK.

Dans le cadre de l'invention, une troisième série d'expériences a mis en valeur un test in vitro à l'aide de cellule Jurkat CD16 pour évaluer l'efficacité d'anticorps anti-D. Les Mab ont été incubés pendant la nuit avec des globules rouges rhésus positifs et des 10 cellules Jurkat CD16. La libération d'IL-2 dans le surnageant a été évaluée par ELISA. Une forte corrélation entre l'ADCC et l'activation des cellules Jurkat a été observée, ce qui implique que ce test peut être utilisé pour faire la discrimination des Mabs anti-D en fonction de leur réactivité envers FcgammaRIII (CD16).

15 En conclusion, ces données montrent l'importance des modifications post-traductionnelles de la structure des anticorps pour leur activité ADCC spécifique du FcgammaRIII. La libération de cytokines telles que IL-2 reflète cette activité.

REFERENCES

5 Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y. and
Takahashi, N. A comparative study of the N-linked oligosaccharides structure of
human IgG Subclass proteins. Biochem. J., 268 : 529-537 (1990).

10 Leatherbarrow, R.J., Rademacher, T.W., Dwek, R.A., Woof, J.M., Clark, A., Burton,
D.R., Richardson, N. and Feinstein, A. Effector functions of monoclonal aglycosylated
mouse IgG2a ; binding and activation of complement component C1 and interaction
with human Fc receptor. Molec. Immun. 22, 407-415 (1985).

15 Lund, J., Tanaka, T., Takahashi, N., Sarmay, G., Arata, Y. and Jefferis, R.
A protein structural change in aglycosylated IgG3 correlates with loss of hu Fc_Y RI
and hu Fc_YRIII binding and/or activation. Molec. Immun. 27, 1145-1153 (1990).

20 Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D.,
Rademacher, T.W., Mizuuchi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., Takeuchi, F., Nagano,
Y., Miyamoto, T. and Kobata, A. Association of rheumatoid arthritis and primary
osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature, 316
: 452-457 (1985).

REVENDICATIONS

5 1. Procédé pour mesurer l'activation d'une cellule effectrice appartenant au système immunitaire, transformée ou non, par un anticorps monoclonal (AcMo) ou polyclonal, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence de l'anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la cellule effectrice est une cellule Jurkat exprimant le récepteur CD16.

15 3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'on quantifie au moins une cytokine sélectionnée parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNFa et IFN γ .

20 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on quantifie l'interleukine IL-2.

25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le taux de cytokine produite est un marqueur d'activation ou d'inhibition des cellules effectrices.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le taux d'interleukine IL2 sécrétée reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction FC) et à son efficacité (site antigénique) de liaison à l'antigène.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le taux d'interleukine IL2 sécrétée est corrélé à une activité du type ADCC.

8. Procédé pour évaluer l'efficacité d'un anticorps monoclonal ou polyclonal, 5 caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence d'un anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.
Ce procédé est particulièrement adapté pour évaluer l'efficacité d'un anticorps 10 monoclonal ou polyclonal de spécificité anti-Rh du globule rouge humain.

9. Procédé pour évaluer la capacité d'une cellule à produire un anticorps monoclonal efficace, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence d'un anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure 15 de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les cellules produisant des 20 anticorps sont choisies parmi CHO, YB2/0, les cellules lymphoblastoïdes humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines ou tout autre cellule d'expression.

11. Procédé pour évaluer l'efficacité et de l'intégrité d'anticorps polyclonaux après une 25 étape ou plusieurs étape de purification, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence de l'anticorps purifié et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le taux d'interleukine IL2 sécrétée est corrélé à une activité du type ADCC.
8. Procédé pour évaluer l'efficacité d'un anticorps monoclonal ou polyclonal, 5 caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence d'un anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.
- 10 9. Procédé selon la revendication 8 pour évaluer l'efficacité d'un anticorps monoclonal ou polyclonal de spécificité anti-Rh du globule rouge humain.
- 15 10. Procédé pour évaluer la capacité d'une cellule à produire un anticorps monoclonal efficace, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence d'un anticorps et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.
- 20 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les cellules produisant des anticorps sont choisies parmi CHO, YB2/0, les cellules lymphoblastoïdes humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines ou tout autre cellule d'expression.
- 25 12. Procédé pour évaluer l'efficacité et de l'intégrité d'anticorps polyclonaux après une étape ou plusieurs étape de purification, caractérisé en ce qu'il comprend une mise en contact de cellules effectrice du système immunitaire, transformée ou non, exprimant le récepteur CD16 dans un milieu réactionnel en présence de l'anticorps purifié et de l'antigène dudit anticorps et une mesure de la quantité d'au moins une cytokine 30 produite par la cellule exprimant le récepteur CD16.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on sélectionne les anticorps pour lesquels une augmentation supérieure à 100%, 250%, 500%, ou 1000% du taux de libération d'IL-2 est observée par rapport au contrôle en absence d'anticorps ou en présence d'un anticorps donné comme référence négative.

5

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le mélange réactionnel comprend des d'immunoglobulines humaines (IVIg).

14. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 13 pour évaluer la production d'AcMo par des plantes transgéniques ou de mammifères transgéniques.

10

15. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 13 pour sélectionner des anticorps efficace pour un traitement thérapeutique.

15

16. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 13 pour évaluer la capacité des cellules effectrices d'un patient en réponse à un anticorps monoclonal ou polyclonal approprié pour son traitement.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on sélectionne les anticorps pour lesquels une augmentation supérieure à 100%, 250%, 500%, ou 1000% du taux de libération d'IL-2 est observée par rapport au contrôle en absence 5 d'anticorps ou en présence d'un anticorps donné comme référence négative.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le mélange réactionnel comprend des d'immunoglobulines humaines (TVIg).

10 15. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 14 pour évaluer la production d'AcMo par des plantes transgéniques ou de mammifères transgéniques.

16. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 14 pour sélectionner des anticorps efficace pour un traitement thérapeutique.

15 17. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 14 pour évaluer la capacité des cellules effectrices d'un patient en réponse à un anticorps ménoclonal ou polyclonal approprié pour son traitement.

20

ADCC CMN sur hématies

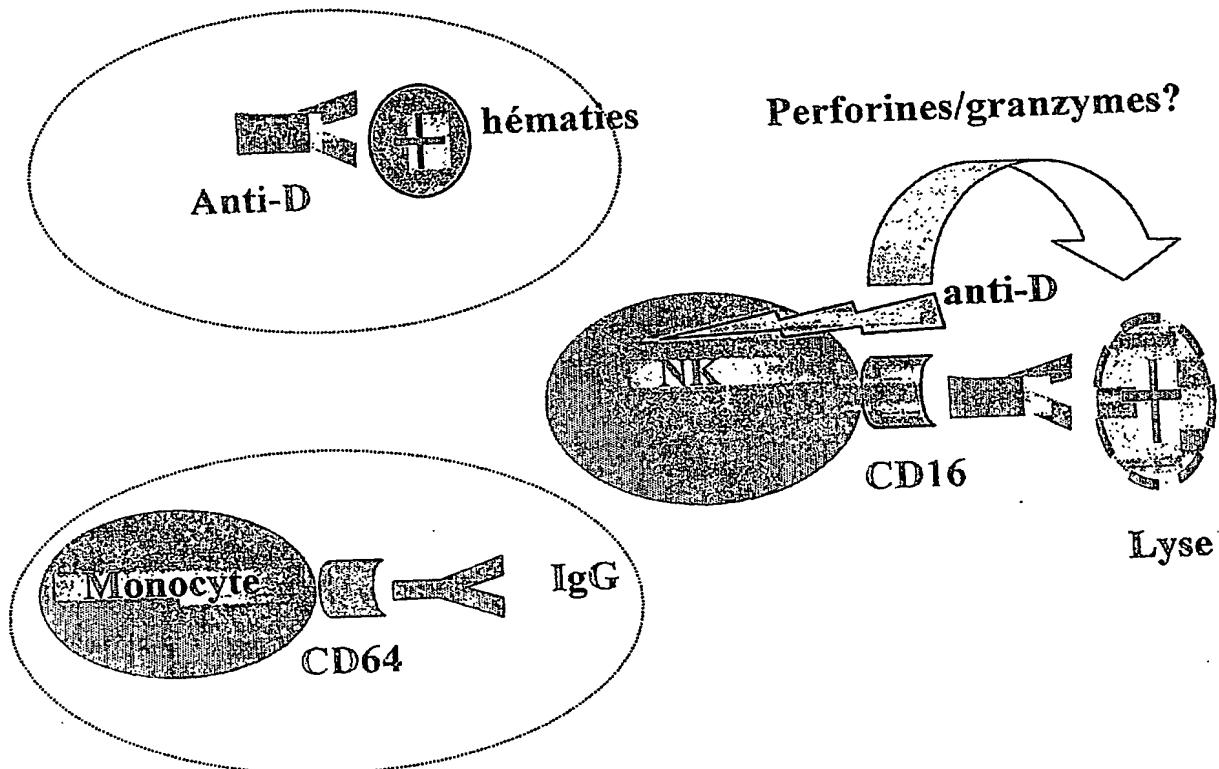


FIGURE 1

ADCC NK sur hématies

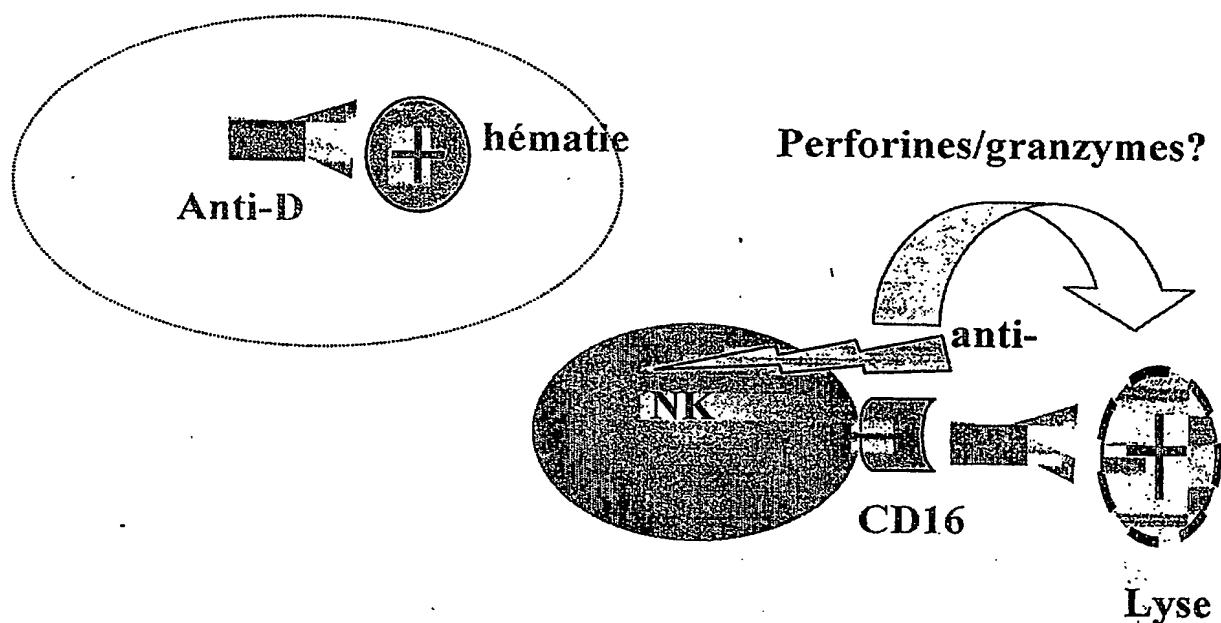


FIGURE 2

ADCC NK . Inhibition en presence de l'anti-CD16 : 3G8
Tox 324 02 015

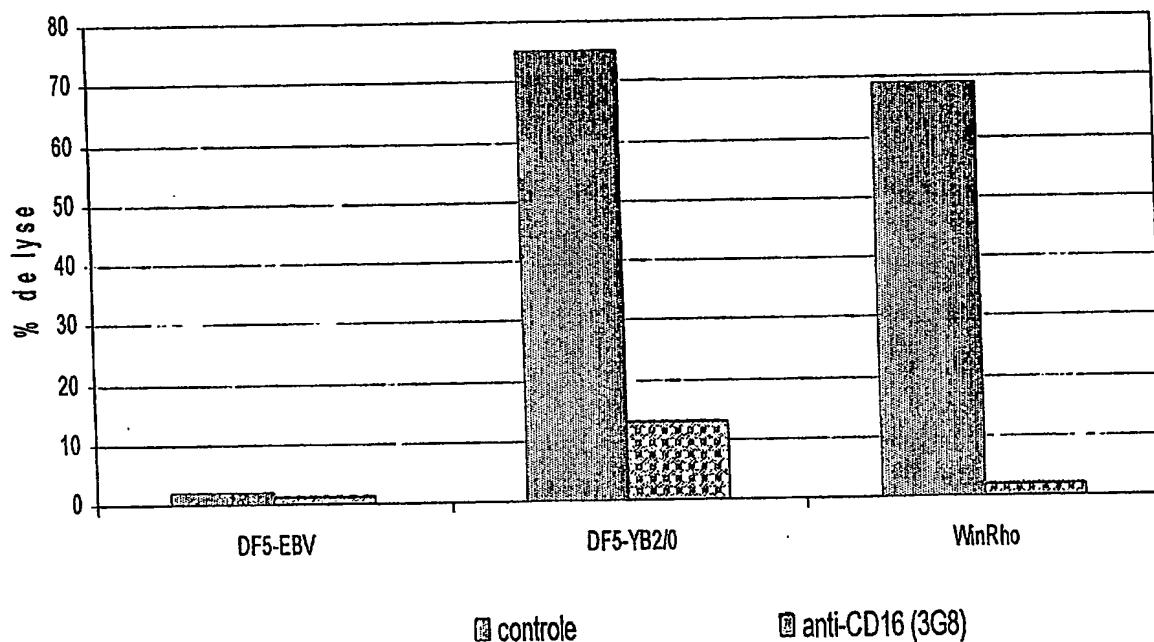
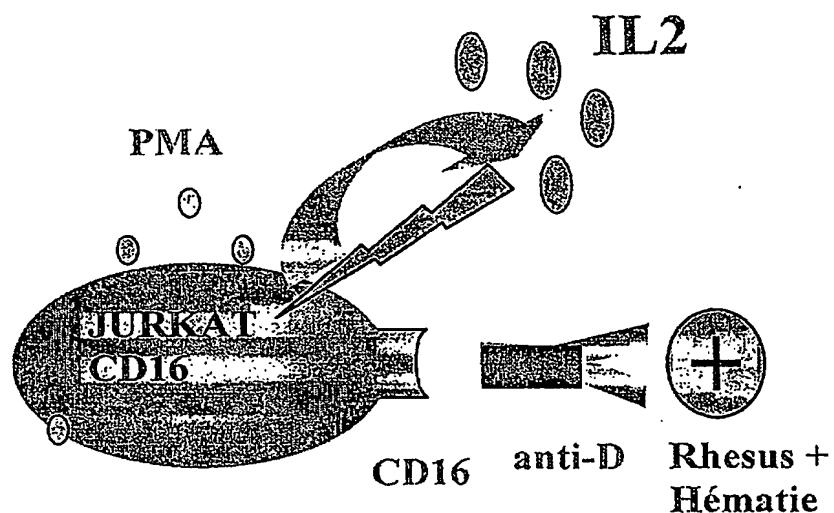
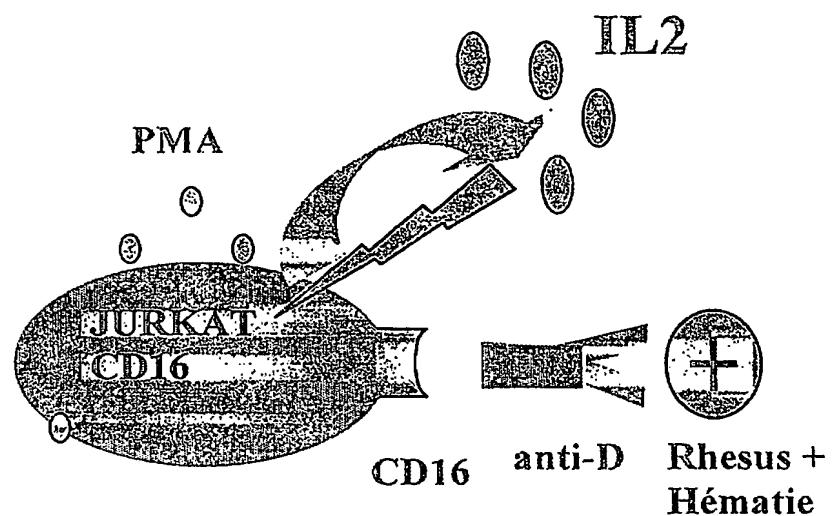


FIGURE 3

Activation de Jurkat CD16 induite par un anti-Rhésus D et production d'IL2**FIGURE 4**

Activation de Jurkat CD16 induite par un anti-Rhésus D et production d'IL2**FIGURE 5**

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N°1...?

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	239864 NT														
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0211416														
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)															
MESURE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES COMME MARQUEUR D'ACTIVATION DE CELLULES EFFECTRICES															
LE(S) DEMANDEUR(S) :															
LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES : Zone d'activité de Courtaboeuf 3 avenue des Tropiques 91940 LES ULIS FRANCE - FRANCE															
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :															
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>de ROMEUF Christophe</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>116, rue de la Bassée</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>59000 LILLE FR</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	de ROMEUF Christophe	Prénoms			Adresse	Rue	116, rue de la Bassée	Code postal et ville	59000 LILLE FR	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	de ROMEUF Christophe													
Prénoms															
Adresse	Rue	116, rue de la Bassée													
	Code postal et ville	59000 LILLE FR													
Société d'appartenance (facultatif)															
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>GAUCHER Christine</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>32, rue des Mésanges</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>59320 SEQUEDIN FR</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	GAUCHER Christine	Prénoms			Adresse	Rue	32, rue des Mésanges	Code postal et ville	59320 SEQUEDIN FR	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	GAUCHER Christine													
Prénoms															
Adresse	Rue	32, rue des Mésanges													
	Code postal et ville	59320 SEQUEDIN FR													
Société d'appartenance (facultatif)															
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>GLACET Arnaud</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>46 rue Ringot</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>59147 GONDECOURT FR</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	GLACET Arnaud	Prénoms			Adresse	Rue	46 rue Ringot	Code postal et ville	59147 GONDECOURT FR	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	GLACET Arnaud													
Prénoms															
Adresse	Rue	46 rue Ringot													
	Code postal et ville	59147 GONDECOURT FR													
Société d'appartenance (facultatif)															
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.															
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		 921169													

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bts, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 ... 2 ...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)
0211416

MESURE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES COMME MARQUEUR D'ACTIVATION DE CELLULES EFFECTRICES.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES : Zone d'activité de Courtabœuf 3,
avenue des Tropiques 91940 LES ULIS FRANCE - FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/> Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue	DHAINAUT Frédéric	
	Code postal et ville	91400 BOISSY LE SEC FR	
<input type="checkbox"/> Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue	BOUREL Dominique	
	Code postal et ville	951 Avenue Germaine 91110 LA MADELEINE FR	
<input type="checkbox"/> Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			

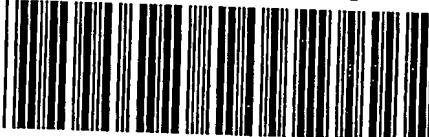
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

Martin 92/169

PCT Application

FR0302714



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.